

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Biotekniikka

2013

Johannes Kettunen

# RUSKEAN RASVAN HAPENKULUTUKSEN MITTAAMINEN



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU  
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Koulutusohjelman nimi | Biotekniikka

Opinnäytetyön valmistumisajankohta 2013 | Sivumäärä 39

Ohjaajat: Suvi Ruohonen, FT ja Ilari Suominen, FT, Dos.

Johannes Kettunen

## RUSKEAN RASVAN HAPENKULUTUKSEN MITTAAMINEN

Opinnäytetyön tavoitteena oli pystyttää menetelmä eristettyjen ruskean rasvan solujen hapenkulutuksen mittaamiseksi sekä tutkia ruskean rasvan hapenkulutuksen eroavaisuuksia  $\alpha$ -2-adrenoseptori-A,  $\alpha$ -AC poistogeenisillä (engl. knock-out ( $\alpha$ 2-KO)) ja villityypin hiirillä. Aiemmissa tutkimuksissa on havaittu lihomiseroja  $\alpha$ 2<sub>A</sub>-KO,  $\alpha$ 2<sub>AC</sub>-KO ja villityypin hiirten välillä. Hypoteesina oli, että erot saattaisivat johtua vaihtelusta ruskean rasvan metaboliassa. Opinnäytetyö tehtiin Turun yliopiston biolääketieteen laitoksella, farmakologian osastolla kesän 2012 aikana.

Tutkimuksessa käytettiin Oxygraph-2K korkearesoluutiorespiometriä mittaamaan eristettyjen ruskearasvasolujen hapenkulutusta sekä lähtötasolla että noradrenaliinistimulaation alaisena. Ruskeat rasvasolut eristettiin hiiren lapaluidenvälisestä ruskean rasvan varastosta. Tutkimuksessa käytettiin yhteensä 32 hiirtä, jokaisessa joukossa 5-6 hiirtä sekä uroksia että naaraita. Kaikki hiiret oli lihotettu runsasrasvaisella (engl. high-fat (HF)) dieetillä ennen mittauksia. Tulokset analysoitiin käyttämällä 2-suuntaista ANOVA-testiä

Saadut tulokset viittaavat siihen, että  $\alpha$ 2<sub>A</sub>-KO-hiirten ruskean rasvan metabolinen aktiivisuus on erilainen verrattuna muihin hiiriryhmiin. Lähtötason hapenkulutus on matalampi ja noradrenaliini antaa suuremman vasteen kuin muilla hiirillä. Johtuuko tämä ylipainosta vai tosin päin, sitä ei voi tämän tutkimuksen perusteella sanoa varmasti. Lisätutkimuksia samoin menetelmin tarvitaan normaalipainoisilla hiirillä. Vaihtoehtoisesti noradrenaliinin tuotantoa voitaisiin stimuloida elävillä hiirillä käyttämällä beta-reseptoriagonisteja ja tutkia miten tämä vaikuttaa hiirten lihomiseen.

Laitteiston ja menetelmän pystytys onnistui. Laitetta tullaan mahdollisesti käyttämään vastaavanlaisissa mittauksissa myöhemmin.

### ASIASANAT:

Ruskea rasva, lihavuus, krooninen stressi,  $\alpha$ 2-adrenoseptori, respiometri, non-shivering thermogenesis.

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Degree programme | Biotechnology

Completion year of the thesis 2013 | Total number of pages 39

Instructors: Suvi Ruohonen, Ph.D. and Ilari Suominen Ph.D, Adj.Prof

Johannes Kettunen

## MEASUREMENT OF BROWN FAT OXYGEN CONSUMPTION

The two main goals of this thesis were to set up a method for measuring the oxygen consumption of isolated brown fat cells and to assess the difference in oxygen consumption of brown adipocytes between alpha-2-adrenoceptor-A,  $\alpha_2$ -AC knock-out and wild-type mice. In earlier studies a difference in weight gain between  $\alpha_2$ -KO,  $\alpha_{2AC}$ -KO and wild-type mice was observed and the hypothesis was that the difference might be due to different metabolic activities of the brown fat. The project was carried out at Turku University Institute of Biomedicine, Department of Pharmacology, during summer 2012.

An Oxygraph-2K high resolution respirometer was used to measure the oxygen consumption in isolated mouse brown fat cells obtained from the suprascapular brown fat depots. The Oxygen consumption of the isolated cells was measured at the basal level and after noradrenaline stimulation. Test groups were formed of a total of 32 mice both male and female, 5-6 mice in each group. All mice had been fed a high fat diet to make them overweight. The results were analyzed using 2-way ANOVA.

The results suggest that the brown fat metabolic activity of  $\alpha_2$ -KO mice had altered. The baseline oxygen consumption was significantly lower and the noradrenaline response was higher than with the other mice. Whether this is due to the larger weight gain or vice versa cannot be said based on this study. Additional studies should be conducted with lean normal weight mice or alternatively by stimulating the noradrenaline production of the overweight mice *in vivo* with beta-receptor agonists.

The setting up of the Oxygraph-2K and the method for measuring the oxygen consumption of isolated brown fat cells was successful and might be used for similar tests later on.

### KEYWORDS:

Brown fat, obesity, chronic stress,  $\alpha_2$ -Adrenoceptor, respirometer, non-shivering thermogenesis.

# SISÄLLYSLUETTELO

<b>KÄYTETYT LYHENTEET</b>	6
<b>1 JOHDANTO</b>	7
1.1 Tutkimuksen aihe	7
1.2 Taustaa ja hypoteesi	8
<b>2 RASVAT</b>	10
2.1 Valkoinen rasva	10
2.2 Ruskea rasva	10
2.2.1 Ruskean rasvan tehtävä elimistössä	12
2.2.2 Esiintyminen ihmisessä sekä muissa eläimissä	14
2.2.3 Lämmöntuotto ruskeassa rasvassa	16
2.2.4 UCP – Uncoupling protein - termogeniini	17
<b>3 HIGH FAT –DIEETTI</b>	18
<b>4 ALFA-ADRENERGISET RESEPTORIT</b>	20
<b>5 HIIRET</b>	21
5.1 Villityypin hiiret	21
5.2 $\alpha 2$ -KO-hiiret	21
5.2.1 $\alpha 2_A$ -KO-hiiret	22
5.2.2 $\alpha 2_C$ -KO-hiiret	22
5.2.3 $\alpha 2_{AC}$ -KO-hiiret	23
<b>6 MATERIAALIT, LAITTEET JA MENETELMÄT</b>	24
6.1 Oxygraph-2K	24
6.1.1 Rakenne	25
6.1.2 Sensorin toimintaperiaate	26
6.2 Solueristys	26
6.3 Mittausmenetelmän pysytys	28
6.4 Varsinaiset mittaukset	29
<b>7 TULOKSET JA PÄÄTELMÄT</b>	31
<b>8 VIRHETARKASTELU</b>	34

<b>LIITTEET</b>	36
-----------------	----

<b>LÄHTEET</b>	38
----------------	----

## **LIITTEET**

Liite 1. Puskureiden koostumukset	36
Liite 2. Analyysitaulukko	37

## **KUVAT**

Kuva 1. Lihomiserot genotyyppien ja sukupuolten välillä	9
Kuva 2. Ruskeat rasvasolut eri genotyypeillä	9
Kuva 3. Valkoinen ja ruskea rasvasolu	11
Kuva 4. 10 000 -kertainen suurennos eristetyistä ruskean rasvan solusta	12
Kuva 5. Kylmäjakson vaikutus lämmöntuottoon	13
Kuva 6: Ruskean rasvan sijainti ihmisellä	15
Kuva 7: Lämmöntuotto ruskeassa rasvassa	17
Kuva 8. Oxygraph-2K	24
Kuva 9. Leikkauskuva Oxugraph-2K laitteesta	25
Kuva 10. Sensorin rakenne	26
Kuva 11. Solueristys	28
Kuva 12. Esimerkki laitteen antamasta kuvaajasta.	30
Kuva 13. Tulokuvaaja.	32
Kuva 14. Tutkimuksessa käytettyjen uroshiirten lopetushetken painojen keskiarvot genotyypeittäin.	33
Kuva 15. Tutkimuksessa käytettyjen naarashiirten lopetushetken painojen keskiarvot genotyypeittäin.	33

## **TAULUKOT**

Taulukko 1: HF -ruuan koostumustaulukko	19
Taulukko 2. Tutkimuksista saadut mittaustulokset.	37

## KÄYTETYT LYHENTEET

$\alpha$ 2-KO-hiiri	Tutkimuksessa käytetty hiirimalli, jolta alfa-2-adrenoreseptori on sammutettu geneettisesti
HF-dieetti	ruokavalio, joka koostuu korkean rasvapitoisuuden (45 % rasvaa) omaavasta ravinnosta (high fat diet)
CAF-dieetti	ruokavalio, joka koostuu runsasenergisestä, -rasvaisesta ja suolaisesta ravinnosta, jossa on vain vähän proteiinia
NSTG	lihasvärinätön lämmöntuotto (engl. non-shivering thermogenesis)
UCP	Uncoupling-proteiini, termogeniini. Proteiini, joka kytkee ATP-synteesin pois päältä avaten samalla protoneille kulun takaisin mitokondrioon. Seurauksena mitokondriossa syntyy lämpöä.
VT	villityyppi. Tutkimuksessa käytettiin C57Bl/6J taustakannasta muokattuja hiiriä. Villityypin hiiret ovat muokkaamattomia C57Bl/6J-kannan hiiriä
BSA	Naudan seerumi albumiini (engl.. Bovine serum albumine)

# 1 JOHDANTO

## 1.1 Tutkimuksen aihe

Ylipaino ja muut liikalihavuuteen liittyvät ongelmat ovat yhä yleisempiä länsimaissa yhteiskunnissa ja tätä vastaan pyritäänkin jatkuvasti keksimään tehokasta hoitomuotoa. Myös liikalihavuuden taustalla vaikuttavat tekijät, kuten stressi, ovat kiinnostuksen kohteena.

Erityistä kiinnostusta on herättänyt hiljattain myös aikuisilta ihmisiltä löydetty ruskea rasva, joka vastaa lihasvärinättömästä lämmöntuotannosta (NSTG: non-shivering thermogenesis) viileissä olosuhteissa, kuluttaen näin tehokkaasti energiaa. Ruskean rasvan on todettu toimivan mahdollisesti myös energiakuiluna aterioinnin jälkeen, jolloin se polttaa tehokkaasti ylimääräisiä kaloreita <sup>1</sup>.

Kiireinen ja stressaava elämäntyyli, jatkuva suorittaminen ja kovat paineet sekä töissä, että vapaa-ajalla ovat yleistyneet länsimaissa viime vuosikymmeninä. Tämän seurauksena on alkanut esiintyä kroonisesta stressistä kärsiviä potilaita. Viimeaikaiset tutkimukset ovat antaneet ymmärtää, että krooninen stressi altistaisi liikalihavuudelle muutenkin kuin syömiskäyttäytymiseen vaikuttavien mekanismien kautta. <sup>2</sup> Yksi näistä mekanismeista saattaisi liittyä ruskean rasvan toiminnan heikkenemiseen pitkään jatkuneen stressitilan seurauksena.

Ruokavaliolla on suuri merkitys lihomiseen. Niin kutsuttu kafeteria-ruokavalio (CAF-dieetti), jota kiireinen elämänrytmi ajaa helposti noudattamaan, edistää painon kertymistä. Kafeteria-ruokavalio koostuu lähinnä valmis- ja pikaruuista, joissa on paljon rasvaa ja sokeria, mutta vähän proteiinia. Tässä tutkimuksessa hiirten lihominen aiheutettiin runsasrasvaisella High Fat (HF) dieetillä, jossa suurin osa energiasta on peräisin rasvasta.

Opinnäytetyön tavoitteena oli tutkia kohonneen sympaattisen hermoston aktiivisuuden vaikutusta ruskean rasvan lämmöntuotantokykyyn HF -dieettiä noudat-

taneilla hiirillä. Kroonista stressiä mallinnettiin kahdella hiirityypillä, joiden adrenoreseptoreja oli muokattu geeniteknisesti, jolloin niiden noradrenaliinin ja adrenaliinin tuotanto ovat jatkuvasti koholla <sup>3</sup>.

Opinnäytetyö oli osa isompaa tutkimuskokonaisuutta, jota suoritetaan Turun yliopiston biolääketieteen laitoksella farmakologian osastolla. Tutkimuskokonaisuudessa pyritään tutkimaan sympaattisen hermoston aktiivisuuden vaikutusta lihavuuden syntyyn. Myös aiemmissa tutkimuksissa malleina on käytetty  $\alpha_2$ - ja  $\alpha_{2AC}$ - Knock Out (KO) hiiriä. Kyseisillä hiirillä on osoitetusti kohonnut sympaattisen hermoston aktiivisuus <sup>3</sup>.

Opinnäytetyön toisena tavoitteena oli pystyttää Oxygraph-2K laitteisto sekä menetelmä hapenkulutuksen mittaamiselle eristetyille ruskean rasvan soluille kyseisellä laitteistolla.

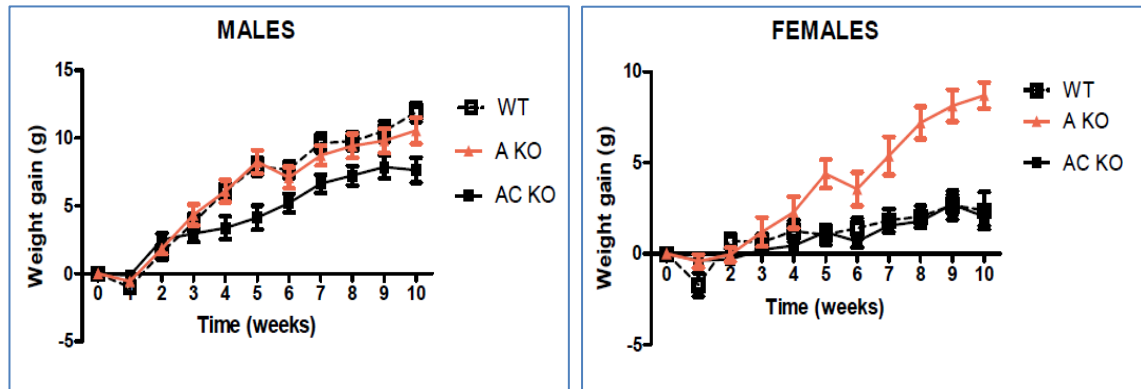
## 1.2 Taustaa ja hypoteesi

Aiemmissa Turun yliopistolla tehdyissä metaboliahäkkitutkimuksissa on todettu, että villityypin (VT) urokset sekä molemmat  $\alpha_2$ -KO sukupuolet lihovat hyvin runsaasti HF-dieetillä. Sen sijaan  $\alpha_{2AC}$ -KO-hiiret eivät liho yhtä runsaasti, myös niiden ruskea rasvakudos on fyysisesti erinäköinen HF-dieetin jälkeen. Se muistuttaa enemmän "normaalia" ruskeaa rasvakudosta, kun lihavilla yksilöillä kudos muuttuu valkoisen rasvan kaltaiseksi (kuva 2).  $\alpha_{2AC}$ -KO-urokset liikkuvat ja syövät saman verran kuin VT- ja  $\alpha_2$ -KO-hiiret. Ero lihomisessa johtuu siis jostain muusta tekijästä.  $\alpha_{2AC}$ -KO-naaraat ovat fyysisesti aktiivisempia kuin muut naaraat, mikä saattaa selittää niiden hoikkuuden. (Suvi Ruohonen henk. koht. tiedonanto)

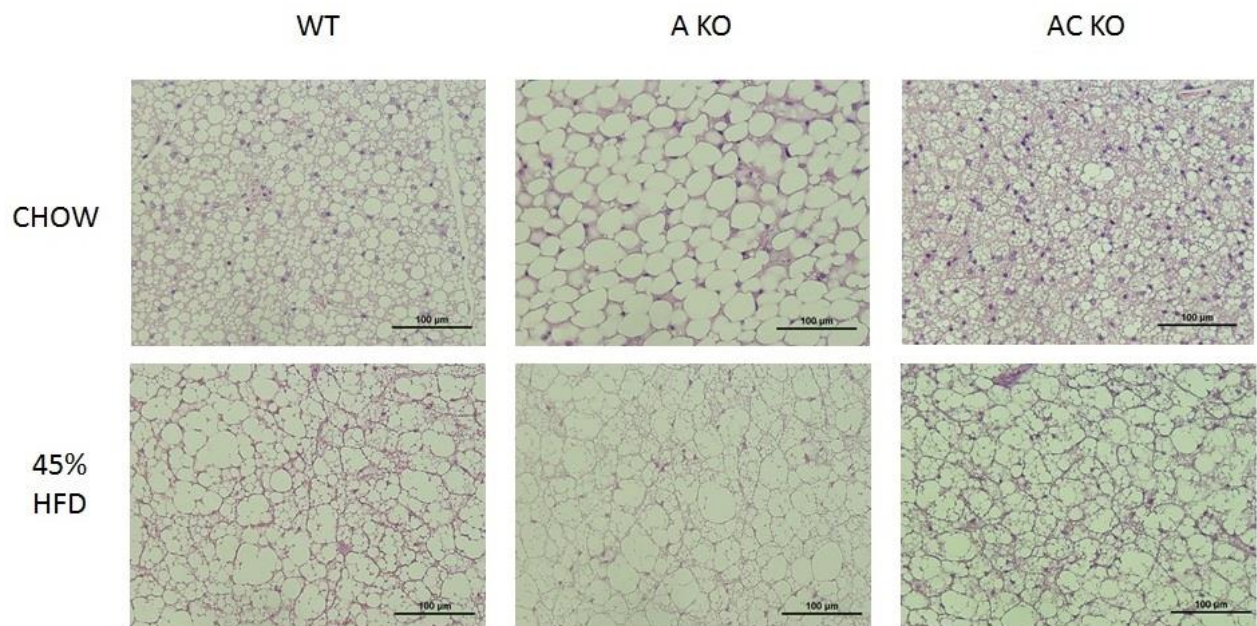
Tästä syystä on päädytty hypoteesiin, jossa  $\alpha_{2AC}$ -KO-urokset eivät liho, koska niiden ruskea rasva on aktiivisempi ja kuluttaa enemmän energiaa. Naarailla ei välttämättä näy eroja ruskean rasvan aktiivisuudessa tai  $\alpha_2$ -KO-naaraiden ruskea rasva on inaktiivisempi kuin  $\alpha_{2AC}$ -KO ja villityypin naaraiden. Kuvassa 1 esitetään hiirten lihomiseroja suhteutettuna alkupainoon. Kuvaajista näkyy, että molemmat  $\alpha_{2AC}$ -KO-sukupuolet lihovat vähemmän kuin muut ryhmät.  $\alpha_2$ -KO-



naaraat lihovat huomattavasti verrattuna muihin ryhmiin. Kuvassa 2 on esitettyä mikroskooppikuvia ruskeasta rasvasolukosta. Kuvista on havaittavissa selkeitä eroja genotyyppien välillä sekä normaalilla ruokaa syöneiden, että HF-ruokaa syöneiden hiirten välillä.



Kuva 1. Lihomiserot genotyyppien ja sukupuolten välillä suhteutettuna alkupainoon. (Ruohonen, S.T. *et. al*, julkaisematon)



Kuva 2. Ruskeat rasvasolut eri genotyypeillä sekä normaalia (CHOW) että HF-ruokaa syöneiden hiirten välillä.  $\alpha 2_A$ -KO-hiirillä solunsisäiset rasvarakkulat ovat huomattavasti suurempia kuin muilla genotyypeillä.  $\alpha 2_A$ -KO-hiirten ruskea rasva muistuttaa enemmän valkoista rasvaa. (Ruohonen, S.T. *et. al*, julkaisematon)

## 2 RASVAT

Ihmisessä sekä muissa nisäkkäissä esiintyy kahta eri rasvatyyppiä, ruskeaa ja valkoista rasvaa. Ruskean rasvan kuvaili ensimmäiseen tieteelliseen artikkeliin sveitsiläinen luonnontieteilijä Konrad Gessner vuonna 1551 <sup>4</sup>. Käytännössä näillä eri rasvatyypeillä on vastakkaiset ominaisuudet: valkoinen rasva varastoi ylimääräistä energiaa triglyserideiksi kun taas ruskea rasva polttaa ylimääräistä energiaa tuottaen lämpöä <sup>5</sup>.

### 2.1 Valkoinen rasva

Yleinen mielipide oli pitkään, että valkoinen rasvakudos on vain passiivinen energiaa varastoiva elin. Tieto kumottiin vuonna 1987 tutkimuksessa jossa valkoisen rasvan todistettiin olevan suuressa osassa sukupuolihormonien tuotantoa. <sup>6</sup> Myöhemmissä tutkimuksissa on osoitettu valkoisen rasvan tuottavan myös adipsiiniä, proteiina joka vastaa triglyseridien varastoutumisesta rasvasoluihin sekä suojaa rasvoja lipolyysiltä, ja leptiiniä, joka on näläntuntemukseen vaikuttava rasvaeritteinen hormoni sekä muita adipokiinejä eli rasvaeritteisiä proteiineja. Valkoisessa rasvassa on havaittu olevan runsaasti reseptoreja, joilla se on yhteydessä hermostoon. <sup>7</sup> Ylimääräisen energian varastointi on kuitenkin valkoisen rasvan pääasiallinen tehtävä. Opinnäytetyö keskittyy ruskeaan rasvaan, joten valkoista rasvaa ei tulla käsittelemään tämän enempää.

### 2.2 Ruskea rasva

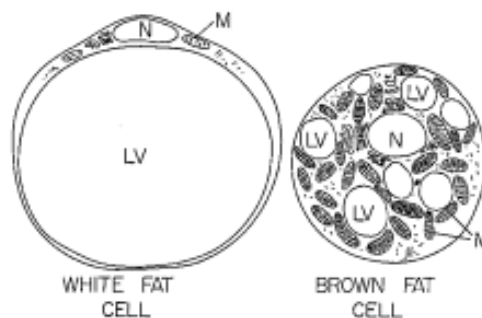
Kuten yllä jo mainittiin, ruskea rasva löytyi vasta 1551, joten se on tieteellisesti varsin uusi elin. Ruskean rasvan lämmöntuotto-ominaisuus selvisi vasta vuonna 1961 ja mahdollinen toiminta energiakuiluna 1979. Ruskeaa rasvaa esiintyy vain nisäkkäillä ja sen uskotaan antaneen useita etuja evoluution kannalta: kyky pysyä aktiivisena viileässä esimerkiksi yöllä ja talviaikaan sekä parempi selviy-

tymiskyky syntymänjälkeisestä kylmästressistä. Ruskea rasvakudos saattaa myös edesauttaa selviytymisessä proteiiniköyhällä ravinnolla.<sup>1</sup>

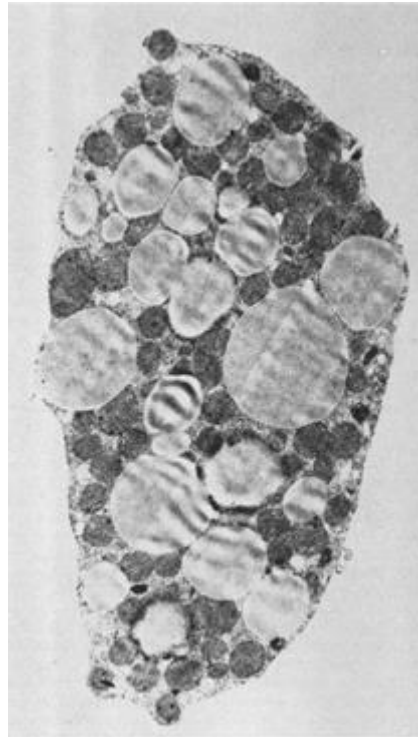
Ruskea rasva eroaa valkoisesta huomattavasti. Ruskeissa rasvasoluissa on runsaasti mitokondrioita kun taas valkoisessa rasvassa niitä on vain vähän. Mitokondrioita on niin paljon, että ne antavat ruskealle rasvalle sille tyypillisen ruskean värin. Ruskean rasvan lämmöntuotanto tapahtuu juuri mitokondrioissa.<sup>1</sup>

Valkoisissa rasvasoluissa rasva on varastoitunut suureksi pisaraksi solun sisälle ja pisara täyttää suurimman osan solun tilavuudesta. Ruskeat rasvasolut ovat kooltaan pienempiä ja niissä rasva on varastoitunut useaksi pieneksi pisaraksi solun sisälle, jolloin rasvapisaroiden ja solunesteen välinen pinta-ala on huomattavasti suurempi kuin valkoisessa rasvasolussa ja rasvan sisältämän energian käyttäminen lämmöntuotantoon tehokkaampaa.<sup>1</sup>

Kuvassa 3 esitetään ruskean ja valkoisen rasvasolun välinen ero piirroksena. Kuvassa 4 on 10 000-kertainen suurennos eristetyistä ruskearasvasolusta. Kuvassa näkyy selkeästi rasvapisaroiden ja mitokondrioiden määrä solussa.



Kuva 3. Valkoinen ja ruskea rasvasolu. N: tuma, M: mitokondrio, LV: lipidivakuoli (<http://www.sportsci.org/encyc/adipose/adipose.html>, viitattu 11.2.2013)



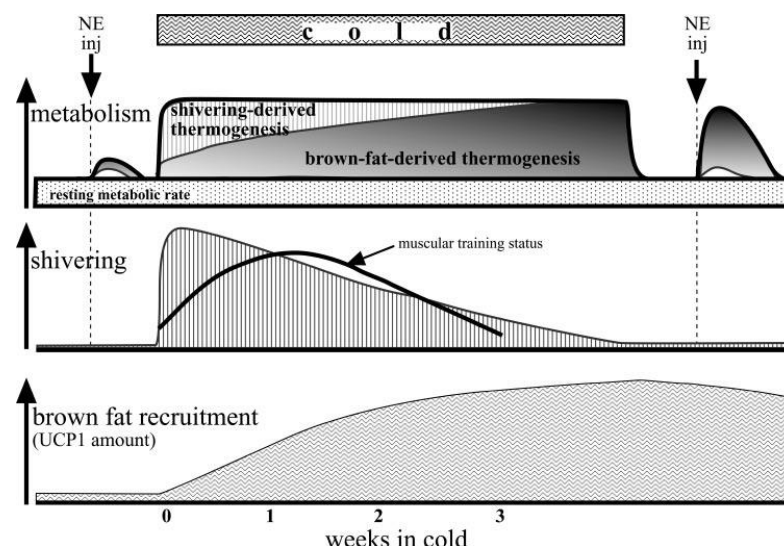
Kuva 4. 10 000 -kertainen suurennos eristetystä ruskean rasvan solusta. Valkoiset kohdat rasvarakkuloita ja tummat mitokondrioita. (J.N. Fain, N. Reed ja R. Saperstein (1967): The isolation and metabolism of brown fat cells)

### 2.2.1 Ruskean rasvan tehtävä elimistössä

Ruskean rasvan tehtävänä on pitää yllä kehon normaalia lämpötilaa ilman lihasvärinää, non-shivering thermogenesis (NSTG). Siirryttäessä lämpöneutraalin alueen alapuolelle keho joutuu tuottamaan lämpöä säilyttääkseen normaalin lämpötilan elimistössä. Nisäkkäät kykenevät tuottamaan lämpöä kahdella tavalla; lihasvärinällä sekä NSTG:n avulla. Ensimmäisessä lämmöntuotto tapahtuu lihasvärinän kautta, etenkin jos eläin ei aiemmin ole joutunut tottumaan kylmiin olosuhteisiin. Tällöin ruskea rasva, jossa NSTG tapahtuu, on menettänyt aktiivisuutensa ja jopa surkastunut pois.<sup>1</sup>

Lämmön tuotanto lihasvärinän avulla kuluttaa paljon energiaa ja lopulta eläin väsyä eikä enää kykene ylläpitämään lämpöä. Pienet nisäkkäät kuten hiiret kykenevät vaipumaan horrostilaan jos lämpötila laskee liikaa tai ravintoa ei ole pitkään saatavilla. Horroksessa eläin laskee mm. kehon lämpötilaa sekä hengitystiheyttä säästääkseen energiaa.<sup>1</sup>

Pitkän kylmälle altistumisen aikana lihasvärinä katoaa lähes täysin eläimiltä, joilla on ruskeaa rasvaa. Ruskea rasva aktivoituu kylmälle altistumisen seurauksena ja lopulta syrjäyttää lihasvärinän. Kylmäjakson jälkeen ruskean rasvan lämmöntuottokapasiteetti säilyy vaikka itse lämmöntuotto lakkaakin. Jos ruskeaa rasvaa stimuloidaan kylmäjakson jälkeen, sen lämmöntuottokapasiteetti on edelleen korkea ja eläin kykenee tuottamaan lämpöä ruskeassa rasvassa nopeasti. Kuvassa 5 esitetään ruskean rasvan aktivoituminen kylmäjakson aikana ja sen potentiaalisen aktiivisuustason pysyminen korkealla kylmäjakson jälkeen.<sup>1</sup>



Kuva 5. Alussa ruskean rasvan lämmöntuotantoa stimuloitiin noradrenaliinilla (NE), mikä aiheutti pienen vasteen. Kolmiviikkoisen kylmäjakson aikana lihasvärinä korvautuu NSTG:llä, mikä näkyy lihasvärinän vähenemisenä ja loppumisena sekä UCP-1 (uncoupling protein-1) proteiinin ekspressoitumisen kasvuna. Kylmäjakson jälkeen noradrenaliini aiheuttaa suuren vasteen ruskeassa rasvassa.<sup>1</sup>

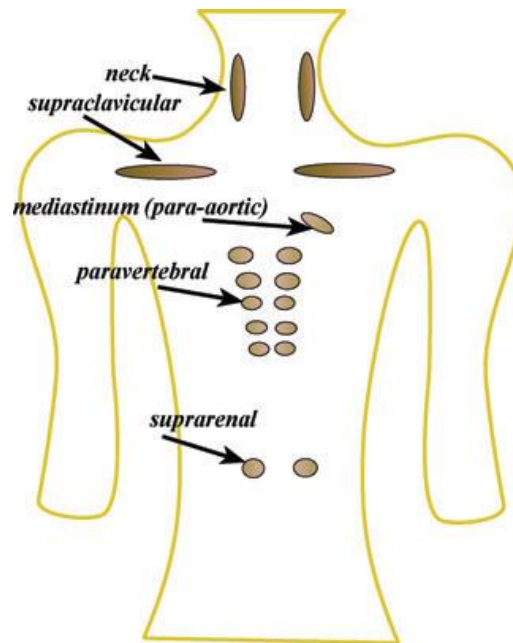
Ainakin piennisäkkäillä, kuten hiirillä ruskean rasvan toissijaisena tarkoituksena toimia energiakuiluna tilanteissa jossa energiaa saadaan liikaa. Keho tarvitsee ravinnosta tietyn määrän proteiinia toimiakseen. Proteiiniköyhää ravintoa joudutaan tällöin syömään enemmän, mikä johtaa suureen energian saantiin. Ruskea rasva kuluttaa tätä ylimääräistä energiaa ja toimii puskurina energian kertymiselle rasvakudokseen auttaen hiiriä pysymään hoikkina. Tutkimuksissa ollaan havaittu proteiiniköyhän ravinnon lisäävän jossain määrin ruskean rasvan mää-

rää hiirillä. Lämmöntuotto toimii samalla tavalla sekä energiakuilu- että kylmä-stressitapauksissa.<sup>1</sup>

### 2.2.2 Esiintyminen ihmisessä sekä muissa eläimissä

Ruskeaa rasvaa esiintyy vain nisäkkäillä. Yksi ruskean rasvan määritteleviä piirteitä on UCP-1:n (uncoupling protein-1) runsas ilmentyminen soluissa. UCP-1:tä ei esiinny muualla kuin ruskeassa rasvassa. Ruskeaa rasvaa on todettu löytyvän nisäkkäiltä useista paikoista, tärkeiden elinten läheisyydestä. Opinnäytetyössä näytteet otettiin hiiriltä lapaluidenvälisestä ruskeasta rasvasta. Hiirillä on lapaluiden välissä selkeät varastot ruskeaa rasvaa. Lisäksi hiireltä löytyy ruskeaa rasvaa munuaisten ja aortan ympäriltä, kylkiluiden välistä sekä niskasta.<sup>1</sup>

Ihmisen ruskean rasvan varastot löydettiin sattumalta syöpäkuvausten yhteydessä. Syöpätutkimuksissa alettiin 90-luvulla käyttää <sup>18</sup>F-fluoro-deoksi-glukoosi-positroni emissio tomografiaa (FDG-PET). FDG-PET:n avulla pystytään paikantamaan alueita, joissa glukoosin imeytyminen on runsasta, kuten syöpäsolukko sekä syövän esiasteen solukko. Kuvauksissa huomattiin FDG:n imeytyvän joillain potilailla symmetrisille alueille kaulaan ja rintakehään. Nämä alueet säilyivät mysteereinä 2000-luvun alkuun, jolloin FDG-PET:iin yhdistettiin tietokonetomografia, jolloin kohteesta saatiin runsaasti lisätietoa.<sup>8</sup> Kuvassa 6 on esitetty kuvauksissa löytyneet ruskean rasvan varastot ihmisellä.



Kuva 6: Ruskean rasvan varastot ovat sijoittuneet ihmisellä tärkeiden elinten ja suurten verisuonten läheisyyteen.<sup>8</sup>

Alkuperäisissä metatutkimuksissa, joissa tutkittiin sairaaloiden arkistoimia FDG-PET kuvia, ruskean rasvan esiintymistiheydeksi arvioitiin 2-7 %. Myöhemmissä ruskealle rasvalle omistetuissa tutkimuksissa esiintymistiheydeksi on saatu 30-100 % kohortista riippuen. On todettu että tutkittavan on koettava lievää vilua kuvauksen aikana, jotta ruskea rasva aktivoituisi ja näkyisi kuvissa. Aiemmissa kuvauksissa tutkittavat olivat olleet normaalissa huoneenlämmössä, jolloin ruskea rasva ei ole aktiivisessa tilassa.<sup>8</sup>

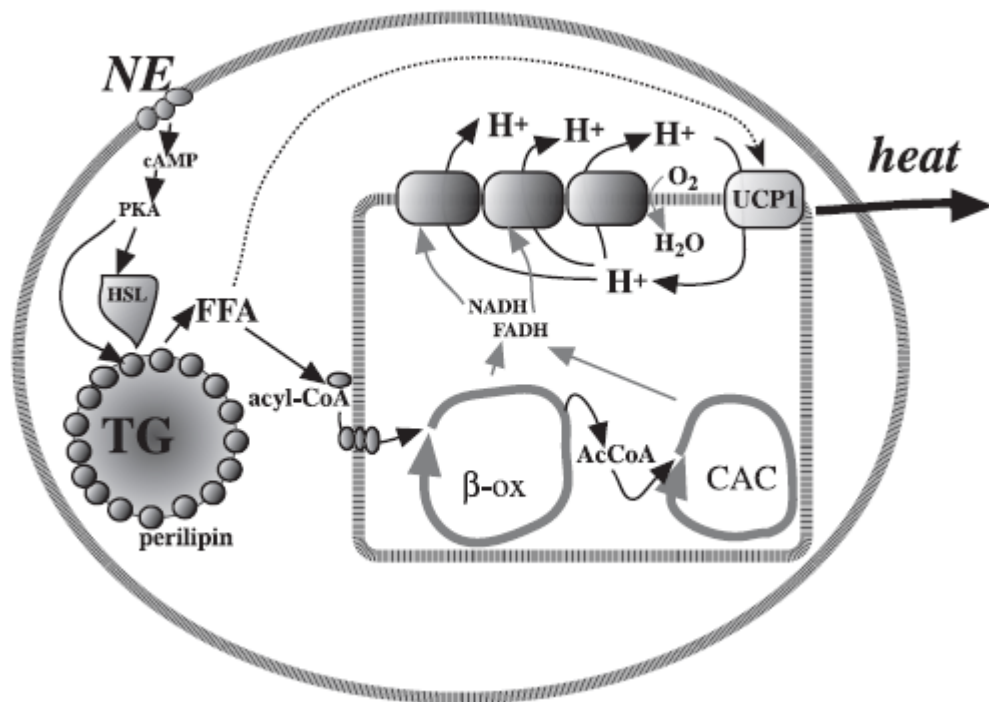
Ruskean rasvan esiintymisen on todettu korreloivan negatiivisesti sekä iän että painoindeksin kanssa. Aktiivisuustaso siis vähenee vanhetessa ja/tai kun painoa kertyy lisää. Sukupuolella ei uskota olevan merkitystä ruskean rasvan esiintymistiheyteen. Tutkimusolosuhteet määritellään yksilöllisesti laskemalla tutkimusympäristön lämpötilaa kunnes koehenkilö alkaa väristä, jonka jälkeen lämpötilaa nostetaan kunnes värinä lakkaa. Näin pyritään varmistamaan, että jokaisella koehenkilöllä on mahdollisimman korkea ruskean rasvan aktiivisuustaso kuvauksen aikana. Tällä menetelmällä estetään mahdollista valkoisen pintarasvan eristysvaikutusta.<sup>8</sup>

### 2.2.3 Lämmöntuotto ruskeassa rasvassa

Hypotalamus kontrolloi ruskean rasvan toimintaa. Kylmän tuntemus sekä ruokailu aktivoivat sympaattista hermostoa, joka hermottaa ruskeaa rasvaa, vapauttaen noradrenaliinia. Noradrenaliini aktivoi syklisen AMP:n (cAMP), joka puolestaan aktivoi proteiinikinaasi A:n (PKA). PKA aktivoi hormoni-herkän lipaasin (HSL) sekä deaktivoi triglyseridipisaraa lipaasilta suojaavan perilipiinikerroksen. HSL pilkkoo triglyseridistä vapaita rasvahappoja, joista syntetisoidaan asetyylikoentsyymi A:ta (A-CoA). Vapaat rasvahapot aktivoivat myös UCP-1:n. A-CoA:sta muokataan asetylikarnitiinia. Asetylikarnitiini pääsee mitokondrion sisälle todennäköisesti karnitiinisiirtäjän välityksellä. Mitokondriosssa asetylikarnitiini muokataan takaisin A-CoA:ksi, josta syntyy  $\beta$ -oksidaation ja sitruunahappokierron seurauksena elektronin välittäjiä NADH:ta ja FADH:ta. Elektronin välittäjät hapetetaan elektronin siirtoketjussa, jolloin mitokondrion hapenkulutus lisääntyy. Hapetuksen seurauksena protoneita pumpataan ulos mitokondriosta, mikä aiheuttaa protonikonsentraatioeron mitokondrion ja sitä ympäröivän soluliman välille, jolloin protonit pyrkivät takaisin mitokondrioon. Aktivoitunut UCP-1 päästää protonit takaisin, jolloin konsentraatioeroon varastoitunut energia muuttuu lämmöksi. Normaalisti protonikonsentraatioeron sisältämä energia käytetään ATP-synteesiin.<sup>1</sup> Kuvassa 7 havainnollistetaan nämä tapahtumat.

Samalla glukoosin ja hapen otto soluun kiihtyy. Glukoosi muutetaan solulimassa pyruvaatiksi ja edelleen A-CoA:ksi, joka siirretään myös mitokondrioon.. Polttoprosessi kuluttaa runsaasti happea; kudoksesta poistuva veri on lähes hapetonta. Polttoprosessin seurauksena syntynyt lämpö kulkeutuu verenkierron mukana nopeasti muualle elimistöön.<sup>8</sup>





Kuva 7: Lämmöntuotto ruskeassa rasvassa.<sup>1</sup> NE: noradrenaliini, cAMP: syklinen adenosinimonofosfaatti, PKA: proteiinikinaasi-A, HSL: hormoniherkkäliapaasi, TG: triglyseridi, FFA: vapaarasvahappo, CoA: koentsyymi-A,  $\beta$ -ox: beta-oksidaatio, CAC: sitruunahappokierto.

#### 2.2.4 UCP – Uncoupling protein - termogeniini

Useat mitokondrioiden välittäjäproteiinit luokitellaan uncoupling-proteiineiksi (UCP) eli termogeniineiksi (uncouple suom. irtikytkeytyä). Näistä termogeniineistä UCP-1 on spesifinen ruskealle rasvalle ja sillä on suuri merkitys ruskean rasvan lämmöntuotantokyvyssä.<sup>1</sup>

Oksidatiivisessa fosforylaatiossa, jonka seurauksena mitokondrioissa syntyy ATP:tä, protoneita pumpataan mitokondrion sisäkalvon ulkopuolelle. Noradrenaliinin vaikutuksesta ruskeassa rasvassa aktivoituu UCP-1, joka sallii protoneiden kulkemisen takaisin mitokondrioon. Tämän seurauksena elektrokemiallinen gradientti katoaa ja substraattien hapettuminen tapahtuu vapaasti ja syntyy lämpöä. UCP-1 siis ikään kuin kytkee ATP-synteesin pois, jolloin protonit vapautuvat hapettamaan substraatteja. Ruskean rasvan lämmöntuotantokyky on täysin riippuvainen UCP-1:n ilmentymisestä.<sup>9</sup>

### 3 HIGH FAT –DIEETTI

Kaikki tutkimuksessa käytetyt hiiret olivat HF -dieetillä. Hiiret ja muut piennisäk-käät ovat normaalisti hyvin resistenttejä lihomiselle, joten hiiret jouduttiin lihot-tamaan HF -dieetillä.

HF -dieetti ei vastaa täysin ihmisen liikalihomista tyypillisesti aiheuttavaa CAF -dieettiä. HF -ruuassa suurin osa energiasta tulee puhtaasti rasvasta, kun taas CAF -dieetti koostuu runsasenergisestä, -suolaisesta, -sokerisesta, matalapro-teiinisesta ja -kuituisesta ravinnosta kuten virvoitusjuomista, sipseistä ja kek-seistä. HF- dieetti ei aiheuta hiirillä yhtä voimakasta tulehdusta ruskeassa ja valkoisessa rasvassa sekä maksassa kuin CAF –dieetti. CAF -dieetti saa myös aikaan hyperinsulinemian, hyperglykemian sekä glukoosi-intoleranssin. Laaja-mittainen tulehdus, hyperinsulinemia, hyperglykemia ja glukoosi-intoleranssi ovat kaikki tyypillisiä oireita liikalihavilla ihmisillä.<sup>10</sup>

Hiirille syötetty ruoka oli Research Diets Inc.:in valmistamaa 45% HF -rehu, jon-ka rasvasta suurin osa on peräisin laardista. Taulukossa 1 on esitettyä hiirille syötetyn HF -rehun tarkempi koostumus.

Taulukko1:HF-ruuan koostumustaulukko  
(<http://www.researchdiets.com/opensource-diets/stock-diets/dio-series-diets>,  
viitattu 23.5.2013)

Product #	D12451	
	gm%	kcal%
Protein	24	20
Carbohydrate	41	35
Fat	24	45
<b>Total</b>		100
<b>kcal/gm</b>	4.73	
Ingredient	gm	kcal
Casein, 80 Mesh	200	800
L-Cystine	3	12
Corn Starch	72.8	291
Maltodextrin 10	100	400
Sucrose	172.8	691
Cellulose, BW200	50	0
Soybean Oil	25	225
Lard	177.5	1598
Mineral Mix S10026	10	0
DiCalcium Phosphate	13	0
Calcium Carbonate	5.5	0
Potassium Citrate, 1 H <sub>2</sub> O	16.5	0
Vitamin Mix V10001	10	40
Choline Bitartrate	2	0
FD&C Red Dye #40	0.05	0
FD&C Blue Dye #1		
<b>Total</b>	<b>858.15</b>	<b>4057</b>

## 4 ALFA-ADRENERGISET RESEPTORIT

Adrenergiset reseptorit eli adrenoseptorit jaetaan kahteen pääryhmään:  $\alpha$ - ja  $\beta$ -reseptorit.  $\alpha$ - ja  $\beta$ -reseptorit jaetaan edelleen seuraaviin alaryhmiin:  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  ja  $\alpha_{1C}$ ,  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$  ja  $\alpha_{2C}$  sekä  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  ja  $\beta_3$ .<sup>11</sup> Opinnäytetyö käsittelee näistä  $\alpha_2$ -ryhmän reseptoreja A ja C.

Adrenergisessä hermostossa presynaptiset  $\beta$ -reseptorit lisäävät aktivoituessaan noradrenaliinin eritystä, kun taas  $\alpha$ -reseptorit inhiboivat eritystä.<sup>12</sup>  $\alpha_2$ -adrenergiset reseptorit ovat tärkeässä osassa sympaattisen hermoston ja adrenergisten neuronien välittäjäaineiden erityksen säätelyssä keskushermostossa. Keskushermostossa  $\alpha_2$ -reseptorit vaikuttavat mekanismeihin, jotka säätelevät verenpainetta, ruumiin lämpötilaa, kivun aistimista, kognitiivisia toimintoja sekä mielialaa.<sup>13</sup>

Kloonaamalla on tunnistettu kolme itsenäistä geeniä, jotka koodaavat  $\alpha_2$ -reseptorin kolmea alatyyppeä;  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$  ja  $\alpha_{2C}$ . Hiiren aivoissa arviolta 90 %  $\alpha_2$ -reseptoreista on  $\alpha_{2A}$ -tyyppiä ja loput 10 %  $\alpha_{2C}$ -tyyppiä.  $\alpha_{2A}$ - ja  $\alpha_{2C}$ -reseptorit ovat pääreseptorit noradrenaliinin vapautuksen säätelyssä aivokuorella.<sup>12</sup>

$\alpha_{2A}$ -reseptoreita esiintyy runsaasti kaikkialla keskushermostossa sekä ääreishermostossa.  $\alpha_{2B}$ -reseptoreita esiintyy pääasiassa vain ääreishermostossa ja  $\alpha_{2C}$ -reseptoreita esiintyy runsaasti aivoissa, joissa ne muodostavat selkeän kuvion.  $\alpha_{2C}$ -reseptoreita esiintyy keskushermostossa  $\alpha_{2A}$ -reseptoreita vähemmän ja ne ovat keskittyneet tietyille alueille.<sup>14</sup>

Yhden nukleotidin vaihtuminen ihmisen  $\alpha_{2A}$ -reseptoreita koodaavassa geenissä ADRA2A:ssa johtaa  $\alpha_{2A}$ -reseptoreiden yliekspressoitumiseen, mikä johtaa mataltuneeseen insuliinin eritykseen ja altistaa riskille sairastua 2-typin diabetekseen.<sup>15</sup>

## 5 HIIRET

Tutkimuksessa käytetty hiirijoukko koostui kuudesta villityypin (VT) uroksesta, viidestä VT-naaraasta, viidestä  $\alpha_2$ -KO uroksesta, viidestä  $\alpha_2$ -KO-naaraasta, kuudesta  $\alpha_{2AC}$ -KO-uroksesta ja viidestä  $\alpha_{2AC}$ -KO-naaraasta. Hiiriä oli siis yhteensä 32 kappaletta. Kaikki hiiret olivat peräisin samasta C57Bl/6J taustakannasta, joka on yksi yleisimpiä laboratoriokokeissa käytettävistä hiirikannoista. Knock-out hiiret olivat siis samaa taustakantaa, mutta reseptoreja koodaavat geenit oli sammutettu.

$\alpha_2$ -KO-hiiriin päädyttiin, sillä niiden koholla olevien noradrenaliini ja adrenaliinitasojen uskottiin vaikuttavan ruskean rasvan toimintaan. Koholla olevilla tasoilla mallinnetaan kroonista stressiä.  $\alpha_2$ -KO-hiirillä pyrittiin siis tutkimaan kroonisen stressin vaikutusta ruskean rasvan toimintaan ja täten kroonisen stressin mahdollista vaikutusta lihomiseen.

Hiiret kasvatettiin Turun yliopiston koe-eläinkeskuksessa normaalioloissa. Kun hiiret olivat 16 - 18 viikon ikäisiä, ne siirrettiin HF-dieetille kolmen viikon ajaksi, jonka jälkeen mittaukset suoritettiin.

### 5.1 Villityypin hiiret

Lihomistutkimuksessa on todettu, että molempien sukupuolten VT –hiiret lihovat runsaasti HF-dieetillä. Lihomisen seurauksena niiden ruskea rasvakudos näyttää myös fyysisesti erilaiselta, muistuttaen enemmän valkoista rasvaa. (S. Ruohonen *et al.* julkaisematon)

### 5.2 $\alpha_2$ -KO-hiiret

Saatavilla olevat farmakologiset ligandit eivät ole riittävän spesifisiä  $\alpha_2$ -reseptorien alatyypeille. Alatyypien tutkimiseen on kehitetty hiirilinjoja, joiden

tietyt  $\alpha_2$ -reseptorit on sammutettu. Reseptoreja koodaavat geenit on inaktivoitu alkion kantasoluista, joista hiirilinjat on sittemmin vakiinnutettu onnistuneesti.<sup>12</sup>

### 5.2.1 $\alpha_{2A}$ -KO-hiiret

Haiman  $\alpha_{2A}$ -adrenoreseptorit inhiboivat insuliinieritystä.  $\alpha_{2A}$ -KO hiirillä esiintyy hyperinsulinemiaa, veren glukoosiarvot ovat alhaalla ja niillä on korkea glukoositoleranssi. Noradrenaliinia esiintyy veri-plasmassa enemmän kuin VT-hiirillä, mutta adrenaliinin määrässä ei ollut eroa.<sup>3</sup>

Käyttäytymistä tutkivien testien mukaan  $\alpha_{2A}$ -KO-hiiret ovat VT-hiiriä herkempiä ympäristön stressitekijöille, syke on korkeampi sekä karvat häntä nousevat herkemmin pystyyn. Noradrenaliinia erittyy aivoissa huomattavasti enemmän, mutta muiden monoamiinien erityksessä ei ole eroja. Käyttäytymistestien perusteella todetaan, että  $\alpha_{2A}$ -KO-hiiret ovat yleisesti ahdistuneempia ja stressaantuneempia kuin VT-hiiret. Aggressiivinen käyttäytyminen vaaratilanteessa, eli niin kutsuttu taistele tai pakene reaktio, on yllättäen alhaisempaa. Yöaktiivisuus on VT-hiiriä alhaisempaa.<sup>13</sup>

Lihomistutkimuksessa  $\alpha_{2A}$ -KO-hiirten todettiin käyttäytyvän samoin kuin VT-hiirten. Myös  $\alpha_{2A}$ -KO-hiiret lihoivat siis runsaasti ja ruskea rasvakudos muuttui valkoisen rasvakudoksen kaltaiseksi. Liikkuminen on myös vähäisempää kuin muilla hiirillä. (Ruohonen, S.T. *et al.*, julkaisematon)

### 5.2.2 $\alpha_{2C}$ -KO-hiiret

$\alpha_{2C}$ -KO-hiirillä insuliinieritys ei eroa VT-hiiristä, mutta glukoositoleranssi on heikentynyt. Lisäksi veri-plasmassa on kaksi kertaa enemmän adrenaliinia kuin VT-hiirillä, mutta noradrenaliinin määrässä ei ole merkittävää eroa.<sup>3</sup>

Käyttäytymistä tutkivien testien mukaan  $\alpha_{2C}$ -KO-hiiret ovat VT-hiiriä herkempiä akustiselle pelkoreaktiolle, pelkoreaktion esipulssivaikutus on pienempi ja hyök-

kääminen tapahtuu nopeammin. Muuten  $\alpha_2$ -KO-hiiret eivät eroa huomattavasti VT- hiiristä.<sup>14</sup>  $\alpha_2$ -KO-hiiriä ei kuitenkaan käytetty tässä tutkimuksessa.

### 5.2.3 $\alpha_2$ -KO-hiiret

$\alpha_2$ -KO-hiirten sympaattisen hermoston aktiivisuus on koholla.  $\alpha_2$ -KO-hiirillä on vastaava glukoosi- ja insuliinifenotyyppi kuin  $\alpha_1$ -KO-hiirillä.  $\alpha_2$ -KO-hiiret ovat herkempiä insuliinin glukoosiarvoja madaltavalle vaikutukselle kuin VT-hiiret. Veriplasmassa esiintyy huomattavasti enemmän noradrenaliinia kuin millään muulla hiirimallilla. Adrenaliinia löytyy plasmasta kaksi kertaa enemmän kuin VT-hiirillä.<sup>3</sup>

$\alpha_2$ -KO-hiiret eivät lihoneet HF -dieetillä yhtä paljon kuin muut hiirimallit. Metaboliahäkkitutkimuksilla uroshiirten todettiin liikkuvan ja syövän samassa suhteessa, eli ne saivat ja kuluttivat saman verran energiaa kuin muutkin hiiret. Mutta muista hiiristä poiketen  $\alpha_2$ -KO-uroshiiret eivät lihoneet.  $\alpha_2$ -KO-naarashiiret olivat muita naaraita aktiivisempia liikkumisen osalta, mikä saattaa selittää niiden hoikkuutta. (Ruuhonen, S.T. *et al.*, julkaisematon)

## 6 MATERIAALIT, LAITTEET JA MENETELMÄT

### 6.1 Oxygraph-2K

Opinnäytetyö tehtiin Oroborosin valmistamalla Oxygraph-2K respirometrillä, joka oli lainassa Turun yliopiston biologian laitokselta. Laite on tarkoitettu fysiologisten mittausten suorittamiseen soluilla ja erityisesti mitokondrioilla<sup>8</sup>. Kuvassa 8 laitteen yleisilme.



Kuva 8. Oxygraph-2K. Kuvassa laitteen yleisilme, josta on erotettavissa molemmat kammiot sekä sensorit. Kammioihin lisätään reagensseja Hamilton-ruiskulla tulpassa olevan reiän kautta.<sup>16</sup>

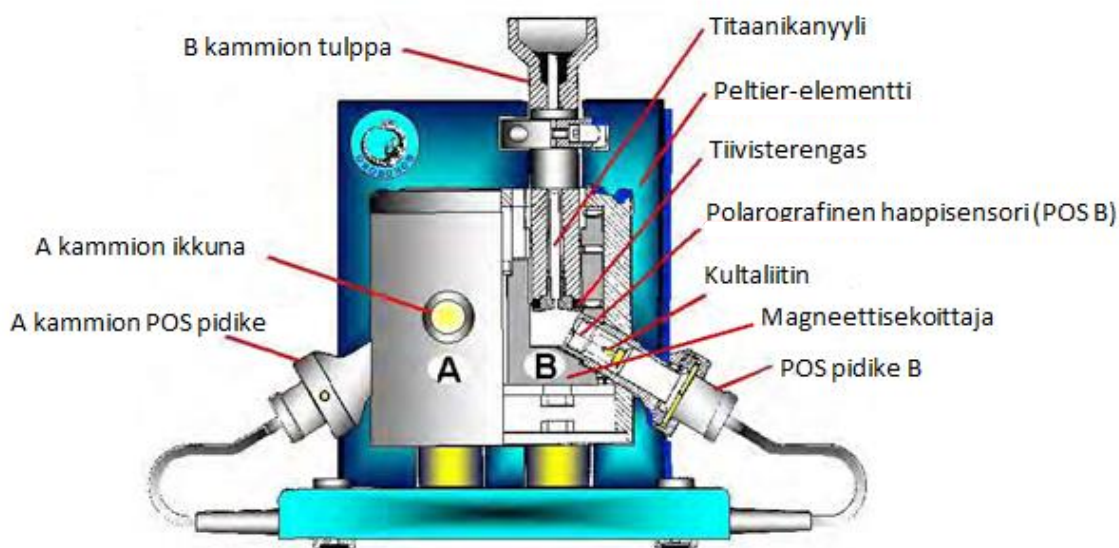
Laite mittaa happikonsentraatiota tutkittavasta liuoksesta. Mittauksiin voidaan käyttää elektrodeja sekä optisia sensoreja. Laitteen toiminta perustuu happikonsentraation mittaamiseen suljetussa kammiossa. Kun kammioon lisätään biologinen näyte, se kuluttaa kammiossa olevaa happea ja happikonsentraatio laskee. Laite tekee kuvaajan happikonsentraatiosta sekä hapenkulutuksesta ajan suhteen ja tulokseksi saadaan kyseisen näytteen hapenkulutus tietyinä hetkenä sekä happikonsentraation kokonaismuutos.<sup>16</sup>

Oxygraph-2K laitetta voidaan käyttää hapenkulutuksen mittaamiseen eristetyistä soluista. Hapenkulutus on verrannollinen lämmöntuottoon.<sup>17</sup>



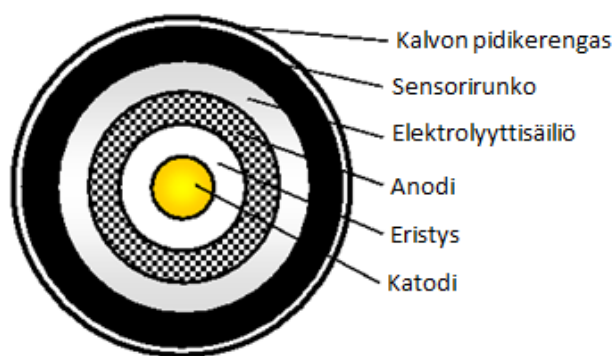
### 6.1.1 Rakenne

Laite koostuu kahdesta lasisesta mittauskammioista, jotka on koteloitu kupariseen lämmityselementtiin. Kammioiden tilavuutta voidaan säätää välillä 1,5 – 3,5 ml. Lämmityselementti on eristetty tarkan lämpötilakontrollin saavuttamiseksi. Kammioiden pohjaan tulee polarografiset happisensorit, jotka tiivistävät kammion pohjan. Kammion yläpää suljetaan reiällisellä tulpalla, jonka läpi kammioon voidaan lisätä reagensseja Hamilton-ruiskua käyttäen. Kammioiden pohjalla on magneettisekoittajat, joiden nopeutta voidaan säätää halutuksi. Kuvassa 9 esitetään laitteen leikkauskuva.<sup>16</sup>



Kuva 9. Leikkauskuva Oxygraph-2K laitteesta. A-kammioon ei ole piirretty tulpaa. B-kammioista on piirretty leikkauskuva.<sup>16</sup>

Sensorissa on itsessään sisäkkäisillä kehillä katodi, joka on eristetty anodista sekä elektrolyyttisäiliö. Elektrolyytinä käytetään 1 molaarista kaliumkloridiliuosta. Sensorin päälle tulee fluorattu etyleeni-propyleeni –kalvo (FEP-kalvo), joka on paksuudeltaan 25 µm. Kuvassa 10 on esitettyä sensorin kärjen rakenne.<sup>16</sup>



Kuva 10. Sensorin rakenne. Kuvassa sensorin kärki, josta voidaan havaita kuvan rakenne.<sup>16</sup>

### 6.1.2 Sensorin toimintaperiaate

Sensorissa on kultainen katodi ja hopea/hopea-kloori anodi. Anodi ja katodi on erotettu toisistaan KCl-liuoksella (eristys) ja tutkittavasta näytteestä happea läpäisevällä kalvolla, joka ei kuitenkaan päästä lävitseen ioneja. 0,6 – 0,8 V jännite johdetaan sensoriin, jolloin nesteeseen liuennut happi diffusoituu kalvon läpi ja katodilla olevat elektronit pelkistävät sen vedeksi ja hydroksidiksi. Anodireaktiona hopea hapettuu ja saostuu Ag/AgCl anodille. Syntyy sähkövirta, joka on riippuvainen nesteessä olevan hapen osapaineesta.<sup>16</sup>

Sensori kalibroidaan kahdella pisteellä; happikylläisyydessä sekä hapen osapaineen ollessa nollassa. Jotta hapen osapaine saadaan muutettua konsentraatioksi, täytyy liuoksen happiliukoisuuden olla tiedossa. Happiliukoisuus riippuu liuoksen suolapitoisuudesta ja lämpötilasta. Tarkka lämpötilakontrolli on tärkeää kunnollisten mittausten saavuttamiseksi.<sup>18</sup>

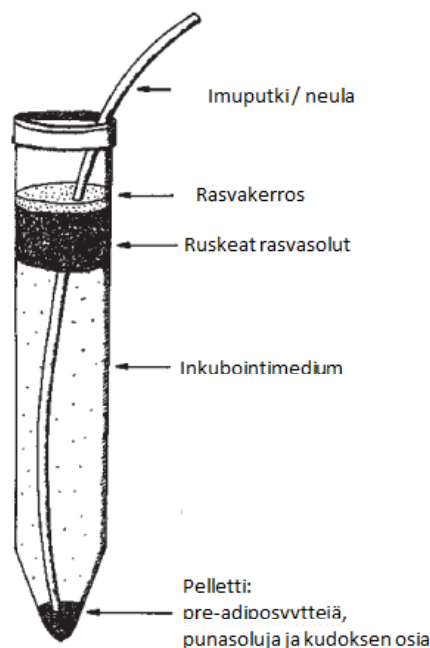
### 6.2 Solueristys

Ruskeat rasvasolut eristettiin hiiren ihonalaisista, lapaluidenvälisistä varastoista menetelmällä, jota käytettiin myös alkuperäisartikkelissa. Alkuperäiseen menetelmään tehtiin muutoksia, sillä riittävä määrä soluja saatiin jo yhdellä pesuker-

ralla. ALKUPEÄRÄINEN artikkeli: Cannon, B. ja Nedergaard, J. Studies of Thermogenesis and Mitochondrial Function in Adipose Tissues <sup>17</sup>

Rasvavarastot leikattiin dekapitoidun hiiren selkäpuolelta lapaluiden välistä ja pilkottiin saksilla koeputkeen, jossa oli 3,5 ml Krebs-Ringer fosfaattipuskuria, 4 % BSA:ta ja 0,83 mg/ml kollagenaasia. Putkea inkuboitiin tunti sekoittavassa vesihauteessa 37 celsius asteen lämpötilassa. Inkuboinnin jälkeen putkeen lisättiin 7 ml Krebs-Riger fosfaattipuskuria, jossa ei ollut BSA:ta eikä kollagenaasia, ja sitä vorteksoitiin 15 sekuntia. Puskureiden koostumukset ovat liitteessä 1.

Liuoksesta suodatettiin hajonnut kudossmassa 2 µm kangassuodattimella. Hajonnut kudossmassa hävitettiin. Soluliuosta sentrifugoitiin 5 min / 65 G. Sentrifugoinnin jälkeen liuoksen pinnalla erottui solukerros, joka koostui lipidierroksesta sekä ruskeista rasvasoluista. Infranatantti imettiin varovaisesti pois käyttämällä pitkää neulaa ja ruiskua. Infranatantti hävitettiin. Lisättiin 10 ml puskuria ja annettiin seistä jäissä, kunnes pinnalla erottui solukerros. Infranatantti imettiin pois, kuten edellä ja solut laskettiin Bürker-kammiossa. Tuloksena oli solususpensio, jossa oli noin  $1 \times 10^6$  solua/ml. Soluliuos pidettiin jäissä mittaukseen asti. Kuvan 11 piirroskuvassa esitetään solujen kerrostuminen.



Kuva 11. Solueristys. Kuvassa tilanne ennen viimeistä infranatantin poistoa.<sup>17</sup>

Mittauksia varten solususpensiosta laimennettiin Krebs-Ringer bikarbonaatti puskuriliuoksella näyte, jossa oli noin 150 000 solua / ml. Krebs-Ringer bikarbonaatti puskuriliuosta hapetettiin 5% CO<sub>2</sub>-kaasulla ennen käyttöä.

Mittaukset tuli suorittaa samana päivänä, sillä solut eivät kestäneet säilyttämistä tai varastointia.<sup>17</sup>

### 6.3 Mittausmenetelmän pysytys

Mittausprotokolla perustui artikkeliin: Cannon, B. ja Nedergaard, J. Studies of Thermogenesis and Mitochondrial Function in Adipose Tissues<sup>17</sup>.

Ennen varsinaisia koemittauksia suoritettiin sarja testimittauksia, joissa määritettiin sopiva solukonsentraatio sekä lisättävän noradrenaliinin määrä. Testimittauksissa varmistettiin myös laitteen toiminta ennen varsinaisia koemittauksia. Testimittauksien mukaan riittävä solukonsentraatio oli noin 150 000 solua / ml. Suurin hapenkulutuspiikki saatiin aikaan lisäämällä kammioihin 15 µl 1mM noradrenaliiniliuosta, jolloin loppukonsentraatio kammiossa oli: 0,0075mM. Testi-

mittauksissa käytettiin muita tutkimuksia varten lopetettujen hiirten ruskeaa rasvaa. Mittausmenetelmä tulee suunnitella erikseen kaikille eri soluille ja mitokondrioille, joten tätä menetelmää ei voi käyttää muuhun kuin eristettyjen ruskan rasvan solujen hapenkulutuksen mittaamiseen noradrenaliinistimulaation alaisena.

#### 6.4 Varsinaiset mittaukset

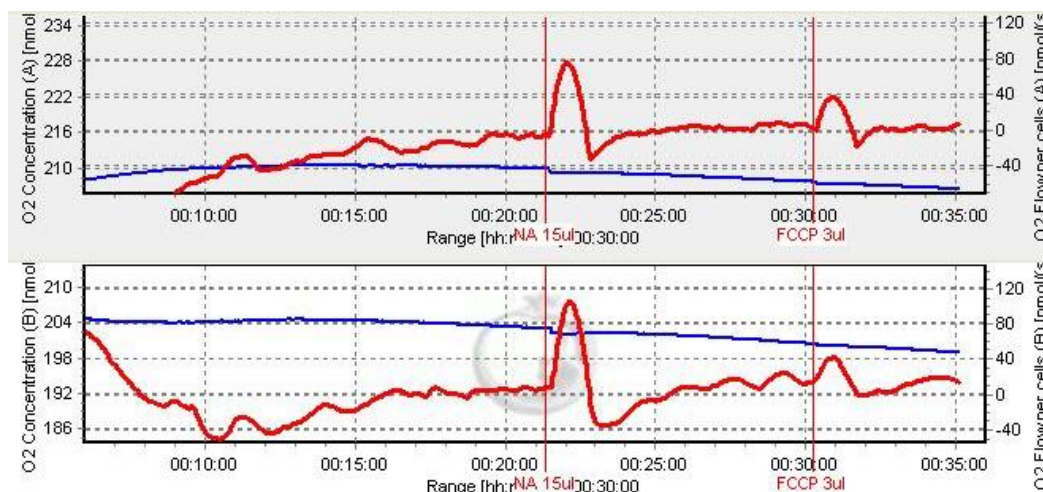
Laite kalibroitiin jokaisen mittauspäivän aamuna. Kalibrointi suoritettiin mittauksessa käytettävällä Krebs-Ringer bikarbonaattiliuoksella sekä happisaturaatiossa, että hapen nollatasolla. Laitteen mittauskammioihin lisättiin halutut näytteet, tässä tapauksessa solususpensio, jossa noin 150 000 solua / ml. Kammioon mahtuu kerralla 2 ml suspensiota, joten kammiossa oli mittaushetkellä noin 300 000 solua. Molempiin kammioihin tuli siis näyte samasta hiirestä, jotta saataisiin samalla kerralla myös rinnakkaismittaus. Varsinaisiin mittauksiin käytettiin yhteensä 32 hiirtä, joista jokaisesta otettiin 2+2 rinnakkaisnäytettä. Mittauksista saatu tulostaulukko on liitteessä 2.

Kun näytteen hapenkulutus tasaantui, kammioon lisättiin 15 µl 1mM noradrenaliinia. Noradrenaliini aiheutti nopean nousun hapenkulutuksessa. Nousun jälkeen hapenkulutus tasaantui lähes yhtä nopeasti nollatasolle.

Tuloksia tarkasteltaessa mittauksista tutkittiin kolmea arvoa:

- Nolla-arvo, joka mitattiin ennen noradrenaliinin lisäystä hapenkulutuksen tasaannuttua
- Noradrenaliinin aiheuttama vaste, joka mitattiin noradrenaliinin lisäyksen aiheuttaman piikin huipusta
- Noradrenaliinipiikin jälkeen mitattiin taso, jolle hapenkulutus laski noradrenaliinivasteen jälkeen.

Kuvassa 12 on esitetty esimerkki mittauksesta, jossa on mitattu molemmilla kammioilla rinnakkaisnäytteet.



Kuva 12. Esimerkki laitteen antamasta kuvaajasta. Vasemmalla Y-akselilla happikonsentraatio (nmol/ml), kuvaajalla sininen viiva. Oikealla Y-akselilla happivuo (pmol/(s\*million cells)), joka näkyy kuvaajassa punaisena viivana. X-akselilla on aika minuutteina.

Samasta näytteestä tehtiin aina kahdet mittaukset, joten lopullinen tulos koostui yhteensä neljästä rinnakkaismittauksesta.

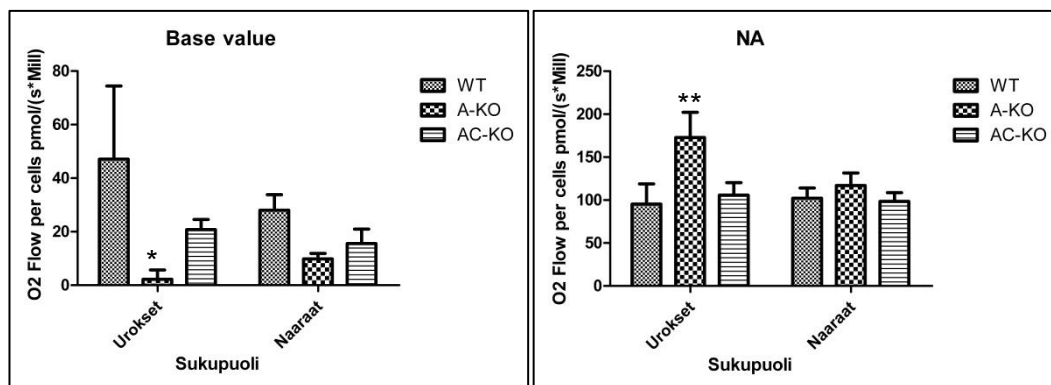
Tulokset kirjattiin Excel-taulukkoon laitteen mukana tulleen ohjelmiston avulla. Excel-taulukosta ne siirrettiin tilastolaskentaohjelmaan (GraphPad Prism), jolla tulokset analysoitiin tilastollisesti merkitsevien eroavaisuuksien havaitsemiseksi. Tuloksista koottu Excel-taulukko löytyy liitteestä 2.

## 7 TULOKSET JA PÄÄTELMÄT

Tulokset olivat hieman yllättäviä ja hypoteesinvastaisia.  $\alpha_2\text{AC}$ -KO-hiirten ja VT-hiirten välillä ruskean rasvan hapenkulutuksessa ei ollut tilastollisesti merkitseviä eroja.  $\alpha_2\text{A}$ -KO-hiirillä löytyi tilastollisesti merkitseviä eroja muihin ryhmiin verrattuna. Eroja odotettiin löytyvän ennemminkin  $\alpha_2\text{AC}$ -KO-hiirillä, niiden erilaisesta lihomismallista johtuen. Alkualettamuksen mukaan hapenkulutuksen olisi pitänyt jäädä korkeammalle tasolle joksikin aikaa, mutta näin ei käynyt vaan hapenkulutus laski takaisin normaalitasolle lähes yhtä nopeasti kuin nousikin. Nousuun ja laskuun kului kuitenkin yhteensä joitakin minuutteja. Hapenkulutuksessa ei esiintynyt suoraan nähtävää eroa hiirityyppien välillä, mutta tilastollisen analysoinnin avulla saatiin esiin seuraavat tulokset:

- $\alpha_2\text{A}$ -KO-genotyypin vaikutus lähtötason ruskean rasvan hapenkulutuksen vaihteluun uroksilla 31,82 %,  $p=0,0088$ , \*\*
- $\alpha_2\text{A}$ -KO-genotyypin vaikutus noradrenaliinivasteeseen vaihteluun uroksilla 19,12 %,  $p=0,0424$ , \*
- Analysointiin käytettiin 2-suuntaista ANOVA-testiä, jotta saataisiin selville sekä genotyypin että sukupuolen merkitys vaihteluun

$\alpha_2\text{A}$ -KO-uroshiirillä lähtötason ruskeanrasvan hapenkulutus oli muita ryhmiä selkeästi matalammalla. Lisäksi niiden noradrenaliinivaste oli muita ryhmiä voimakkaampi.  $\alpha_2\text{A}$ -KO-uroshiirillä ruskean rasvan toiminta näyttäisi siis muuttuneen muihin ryhmiin verrattuna.  $\alpha_2\text{A}$ -KO-naarailla ei näkynyt tilastollisesti merkitsevää eroa muihin ryhmiin verrattuna. Vaikka tilastollisesti merkitsevät erot tulivat esiin uroshiirillä, sukupuolella ei testien mukaan ollut tilastollisesti merkitsevää eroa ruskean rasvan hapenkulutuksessa. Tämän tutkimuksen perusteella ei voida kuitenkaan sanoa, ovatko erot ruskean rasvan hapenkulutuksessa syynä lihomiselle vai seurausta siitä. Kuvassa 13 on esitettynä genotyyppien ja sukupuolten väliset erot lähtötason hapenkulutuksessa ja noradrenaliinivasteessa.



Kuva 13. Tilastollisen analysoinnin seurauksena saadut tulokset pylväskuvaajina (huomaa asteikon vaihtuminen): Kuvaajista on havaittavissa selkeä ero lähtötason- ja noradrenaliinivasteen jälkeisessä hapenkulutuksessa  $\alpha_2$ -KO-uroshiirillä verrattuna muihin uroksiin. Tilastollisesti merkittävää eroa esiintyy myös  $\alpha_2$ -KO-naarailla verrattuna muihin naaraisiin. Tähdet kuvaavat tilastollisen merkittävyyden tasoa: \*  $0,01 \leq p < 0,05$ , \*\*  $0,001 \leq p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

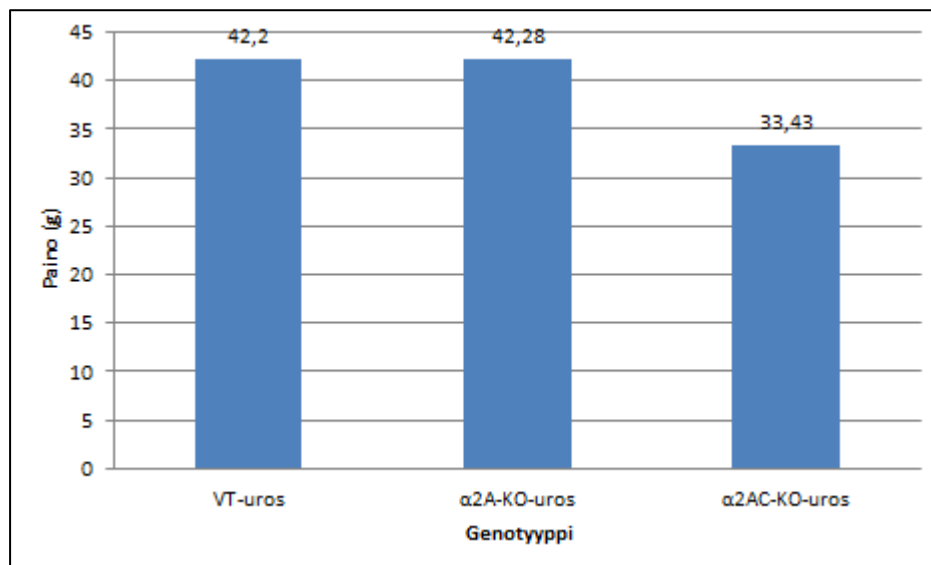
$\alpha_2$ -KO-hiirten ja VT-hiirten välillä ei näyttänyt olevan eroa kummallakaan sukupuolella. Tämä on yllättävä tulos ottaen huomioon  $\alpha_2$ -KO-hiirten lihomisresistenssin sekä fyysisen eroavaisuuden ruskeassa rasvassa. Syy  $\alpha_2$ -KO-hiirten erilaiselle lihomiskäyttäytymiselle ei siis selvinnyt tämän tutkimuksen perusteella.

Saadut tulokset saattaisivat viitata siihen, että  $\alpha_2$ -KO-hiirten ruskean rasvan aktiivisuus on laskenut normaalitasolla alemmas eli noradrenaliinin vaikutus on laskenut. Noradrenaliinistimulaation jälkeen saadaan kuitenkin voimakas reaktio, mikä saattaa viitata siihen, että ylitetään tietty kynnyks, jonka jälkeen lämmöntuotto kiihtyy voimakkaasti.  $\alpha_2$ -KO-hiirillä normaalitason hapenkulutus on  $\alpha_2$ -KO-hiiriä korkeammalla, mikä saattaa johtua noradrenaliinin runsaammasta erittymisestä. Stimulaation jälkeen hapenkulutuspiikki on kuitenkin pienempi, eli tiettyä tasoa ei saada ylitettyä tällä annostuksella, mikä viittaa siihen, että vaste on heikentynyt.

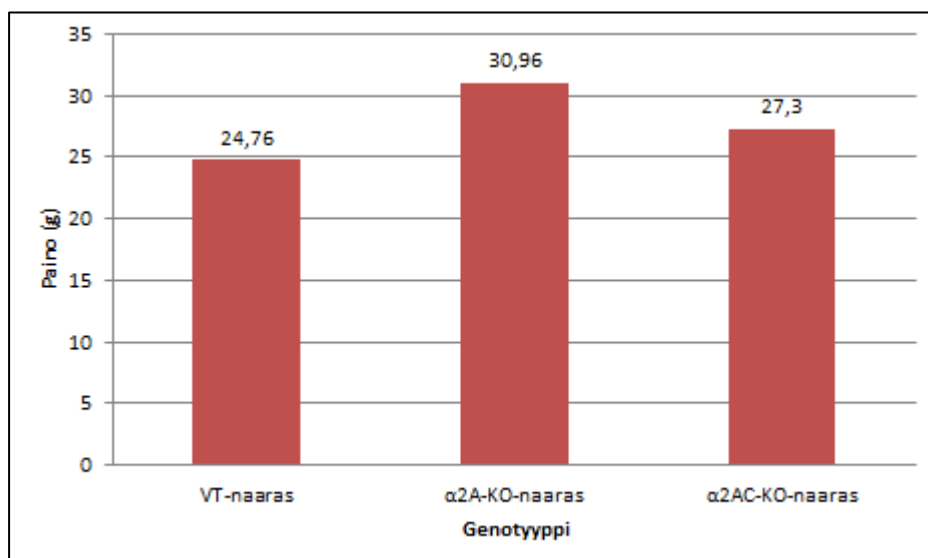
Kuvissa 14 ja 15 on esitetty tähän tutkimukseen käytettyjen hiirten painojen keskiarvot genotyypeittäin ja sukupuolittain eriteltynä. Keskiarvoista on havaittavissa, että hiiret lihoivat samoin kuin aiemmissakin tutkimuksissa.



Tutkimukset  $\alpha 2$ -KO-hiirten parissa jatkuvat yliopistolla. Oxygraph-2K –laitteistoa ja ruskean rasvan hapenkulutuksen mittaamiseksi pystytettyä menetelmää tullaan mahdollisesti käyttämään myöhemmissä tutkimuksissa esimerkiksi normaalipainoisilla hiirillä samoista koeryhmistä, kuin mitä tämä opinnäytetyö käsiteli.



Kuva 14. Tutkimuksessa käytettyjen uroshiirten lopetushetken painojen keskiarvot genotyypeittäin.



Kuva 15. Tutkimuksessa käytettyjen naarashiirten lopetushetken painojen keskiarvot genotyypeittäin

## 8 VIRHETARKASTELU

Tuloksiin vaikuttaa tällaisessa tutkimuksessa monta tekijää. Laite ei toiminut koko ajan halutulla tavalla. Muun muassa nolla-kalibroinnin kanssa esiintyi ajoittain ongelmia, eikä molemmista kammioista saatu kaikilla mittauskerroilla toisiinsa vastaavia rinnakkaistuloksia. Tämä saattaa johtua siitä, että laitteen sensoreita oli säilytetty eri tavoilla. Toinen sensori oli ollut alkuperäisessä säilytysrasiassa ja toinen petrimaljalla silikarakeiden kanssa.

Solujen kanssa työskenneltäessä virheiden mahdollisuus on aina suuri, etenkin kun solut ovat eri lähteistä, tässä tapauksessa solut tulivat yhteensä 32 eri hiirestä. Vaikka solujen eristäminen ja säilyttäminen pyrittäisiin aina tekemään samalla tavalla, saatavien solujen laatu ja elinvoima *ex vivo* vaihtelee. Tällöin myös noradrenaliinin vaikutus eristettyihin soluihin vaihtelee.

Myös kammioihin ruiskutetun noradrenaliinin määrä vaihtelee todellisuudessa kuitenkin jonkin verran, sillä noradrenaliini ruiskutettiin manuaalisesti Hamilton-ruiskulla. Myös noradrenaliinin teho saattaa vaihdella sulatuksen ja pakastuksen seurauksena.

Suhteellisen pienistä näytetyhmistä, 5-6 hiirtä per ryhmä, on myös vaikea saada esiin luotettavia ja tilastollisesti merkitseviä eroja.

Itse mittausmetodi on myös epäsuora, sillä lämmöntuotantoa tutkimaan hapenkulutusta seuraamalla sillä olettamuksella, että ne ovat suoraan verrannollisia keskenään. Epäsuoraa mittausmetodia käytettäessä, tulokset ovat erittäin herkkiä muiden muuttujien, etenkin hapen konsentraatioon mittausliuoksessa liittyvien, vaihtelulle.

Jos tutkimus suoritettaisiin uudelleen, olisi parempi käyttää suoraa lämmöntuotantoa mittaavaa metodia kuten mikrokalorimetriä. Suurempien tutkimusryhmien käyttö antaisi luotettavampia tuloksia.

Epävarmuustekijöistä ja virhemahdollisuuksista huolimatta opinnäytetyön työosuus sujui hyvin. Solueristykset onnistuivat poikkeuksetta ja mittauksetkin antoivat kohtalaisen tasaisia tuloksia kullakin hiiriryhmällä.

## LIITTEET

Käytettyjen puskureiden koostumukset.

Krebs/Ringer-fosfaattipuskuri:

$\text{Na}^+$  148 mmol/l

$\text{K}^+$  6.9 mmol/l

$\text{Ca}^{2+}$  1.5 mmol/l

$\text{Mg}^{2+}$  1.4 mmol/l

$\text{Cl}^-$  119 mmol/l

$\text{SO}_4^{2-}$  1.4 mmol/l

$\text{H}_2\text{PO}_4^-$  5.6 mmol/l

$\text{HPO}_4^{2-}$  16.7 mmol/l

glukoosia 10 mmol/l

fruktoosia 10 mmol/l

(4 % BSA)

pH säädetään 7,4:ään

Krebs/Ringer-bikarbonaattipuskuri :

$\text{Na}^+$  145 mmol/l

$\text{K}^+$  6.0 mmol/l

$\text{Ca}^{2+}$  2.5 mmol/l

$\text{Mg}^{2+}$  1.2 mmol/l

$\text{Cl}^-$  128 mmol/l

$\text{SO}_4^{2-}$  1.2 mmol/l

$\text{HCO}_3^-$  25.3 mmol/l

$\text{H}_2\text{PO}_4^-$  1.2 mmol/l

glucose 10 mmol/l

fructose 10 mmol/l

4% BSA

Hapetetaan 5%  $\text{CO}_2$  ennen käyttöä ja säädetään pH 7,4:ään

Yliopiston henkilökunta valmisti puskurit käyttööni, joten tarkempia tietoja ei ole saatavilla.

Taulukko 2. Tutkimuksista saadut mittauks tulokset. Valkoisella pohjalla olevat on jätetty tulostarkastelusta pois epätavallisen suurten lukemien takia.

Pvm	Nro	Tyyppi	Paino (g)	1. mitta				2. mitta				Kammio
				Base	NA 15ul	FCCP 3ul	lux koholl	Base	NA 15ul	FCCP 3ul	lux koholl	
31.7.12	1	WT-U	38,9	0,65	41,04	9,03	- / -	9,00	82,60	31,04	+ / +	A
	1			32,02	28,46	31,55	- / -	10,35	26,59	33,41	+ / +	B
31.7.12	2	WT-U	40,3	2,00	26,27	26,18	- / -	18,80	109,40	22,36	- / -	A
	2			30,07	51,75	79,10	- / -	38,56	54,21	15,20	- / -	B
1.8.12	3	WT-U	44,0	33,59	267,28	45,37	+ / -	17,06	126,14	63,13	+ / -	A
	3			64,17	243,27	136,36	+ / -	50,83	140,45	60,44	- / -	B
1.8.12	4	WT-U	44,8	-1,90	163,91	14,03	- / -	-8,33	59,39	34,88	+ / -	A
	4			46,13	113,62	63,00	- / -	45,18	520,32	608,34	- / -	B
2.8.12	5	WT-U	42,2	12,82	90,10	31,56	- / +	3,44	59,54	25,09	- / -	A
	5			76,73	198,37	204,75	- / +	18,69	72,09	25,95	+ / -	B
3.8.12	7	WT-U	42,9	1,58	121,42	28,39	+ / -	-13,57	28,39	20,67	+ / -	A
	7			20,17	450,15	17,62	- / -	-16,85	76,59	40,75	- / +	B
14.8.12	17	WT-N	29	1,55	36,43	16,18	+ / -	5,33	107,33	32,90	- / -	A
	17			10,54	152,17	25,58	+ / +	2,79	42,75	30,49	- / +	B
15.8.12	20	WT-N	24,5	44,41	311,14	67,54	+ / +	12,48	195,50	58,43	- / -	A
	20			68,35	136,99	55,87	+ / +	22,96	62,27	79,99	- / +	B
23.8.12	25	WT-N	24,2	38,90	90,56	46,59	- / -	27,47	74,74	24,94	- / -	A
	25			38,68	100,31	68,12	- / -	28,89	214,58	143,56	- / +	B
24.8.12	28	WT-N	20,7	42,53	111,25	46,32	- / -	35,69	166,54	56,12	+ / -	A
	28			23,70	183,22	57,43	- / -	32,65	156,33	196,59	- / -	B
27.8.12	29	WT-N	25,4	47,10	102,36	48,03	- / -	45,10	135,88	50,20	- / -	A
	29			22,39	121,14	51,84	- / -	8,81	102,97	83,36	- / -	B
2.8.12	6	A-KO-U	42,7	8,64	69,25	26,47	- / -	25,95	209,64	414,73	+ / -	A
	6			4,13	82,61	30,61	- / -	9,20	169,37	57,96	+ / +	B
3.8.12	8	A-KO-U	42,7	-4,17	334,69	27,84	- / -	-6,35	49,41	187,10	- / -	A
	8			-7,32	74,71	98,50	- / +	6,81	161,99	489,25	- / -	B
7.8.12	10	A-KO-U	43,6	10,40	167,46	-0,83	- / -	-8,15	154,63	157,17	+ / +	A
	10			7,31	64,75	17,75	- / -	18,04	53,21	39,07	- / -	B
8.8.12	12	A-KO-U	40,5	9,93	470,35	100,43	+ / +	2,68	390,65	41,36	+ / -	A
	12			5,03	48,68	16,10	+ / +	-6,66	79,97	22,60	+ / -	B
10.8.12	15	A-KO-U	42,5	-4,60	75,92	37,74	- / -	-40,17	349,33	271,84	+ / +	A
	15			8,19	104,69	42,10	+ / +	5,67	389,56	53,30	+ / +	B
7.8.12	9	A-KO-N	27,4	2,76	285,06	33,24	+ / -	-1,69	62,68	45,35	+ / -	A
	9			17,46	311,99	80,03	+ / +	0,17	37,78	91,08	- / +	B
8.8.12	11	A-KO-N	30,5	34,10	125,49	49,70	- / -	7,90	152,55	27,13	+ / -	A
	11			5,37	63,34	18,98	- / -	-3,15	77,20	20,97	+ / +	B
9.8.12	14	A-KO-N	35,0	8,56	197,32	214,76	+ / -	3,43	32,09	1,45	- / -	A
	14			5,19	90,99	24,57	+ / -	13,73	57,77	27,39	- / +	B
16.8.12	21	A-KO-N	32,3	-50,10	163,80	16,33		5,10	437,92	16,71	+ / -	A
	21			15,79	89,82	41,04		5,60	77,19	85,02	+ / +	B
17.8.12	24	A-KO-N	29,6	-3,52	199,91	36,94	+ / -	39,56	201,25	25,10	+ / -	A
	24			16,18	49,48	44,32	- / -	15,69	75,53	39,08	+ / -	B
14.8.12	18	AC-KO-U	33,4	16,98	118,26	34,29	+ / +	-0,30	56,17	32,96	+ / +	A
	18			19,23	113,18	63,72	+ / +	3,64	76,58	20,81	+ / +	B
15.8.12	19	AC-KO-U	32,5	11,62	90,02	53,11	+ / +	-0,12	82,07	33,06	- / -	A
	19			16,47	87,72	55,14	- / +	9,04	84,06	28,06	- / -	B
16.8.12	22	AC-KO-U	33,7	1,64	287,69	21,85	+ / -	-7,24	179,09	15,28	+ / -	A
	22			93,91	221,46	95,89	+ / -	10,01	85,29	24,76	+ / +	B
17.8.12	23	AC-KO-U	28,3	0,80	118,37	18,30	+ / -	8,66	167,26	22,34	+ / -	A
	23			18,37	109,95	42,82	+ / -	56,95	174,76	52,82	+ / -	B
24.8.12	27	AC-KO-U	27,3	37,23	95,57	44,42	+ / -	29,38	119,61	66,83	- / -	A
	27			25,73	72,36	34,88	+ / -	30,25	144,80	44,92	- / -	B
28.8.12	31	AC-KO-U	45,4	40,30	160,48	70,71	- / -	30,39	151,60	32,73	+ / -	A
	31			21,08	101,48	30,30	- / -	23,93	136,45	52,08	+ / -	B
9.8.12	13	AC-KO-N	27,2	9,06	101,47	60,72	+ / +	-8,38	209,57	43,94	+ / +	A
	13			2,56	71,11	68,06	+ / +	6,81	60,02	26,62	+ / +	B
10.8.12	16	AC-KO-N	32,5	-1,75	101,88	34,83	- / -	-3,40	82,85	7,90	- / -	A
	16			10,81	314,26	57,01	- / -	7,11	162,41	45,16	- / -	B
23.8.12	26	AC-KO-N	26	47,34	77,63	34,03	- / -	23,74	107,66	37,93	+ / -	A
	26			17,51	110,14	30,14	- / -	27,21	53,28	83,94	- / -	B
27.8.12	30	AC-KO-N	21,9	33,85	176,39	58,01	+ / -	31,91	114,36	50,41	- / -	A
	30			7,12	115,55	67,31	- / -	13,42	92,51	49,52	- / -	B
28.8.12	32	AC-KO-N	28,9	29,35	194,48	37,56	+ / -	22,73	125,29	42,33	+ / -	A
	32			9,23	81,71	41,78	- / -	25,56	114,63	22,78	- / -	B

# LÄHTEET

- <sup>1</sup> Cannon, B. ja Nedergaard, J. (2004): Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiol Rev* 84: 277–359
- <sup>2</sup> Scott, K.A., Melhorn, S.J. ja Sakai, R.R (2012): Effects of Chronic Social Stress on Obesity. *Curr Obes Rep.* 2012 Mar; 1(1):16-25
- <sup>3</sup> Ruohonen, S.T., Ruohonen, S., Glisbach, R., Savontaus, E., Schenin, M. ja Hein, L. (2012): Involvement of  $\alpha_2$ -Adrenoreceptor subtypes A and C in Glucose Homeostasis and Adrenaline-Induced Hyperglycaemia. *Neuroendocrinology* 96(1): 51-9
- <sup>4</sup> Cannon, B. ja Nedergaard, J. (2008): Developmental biology: Neither fat nor flesh. *Nature* 2008 Aug. 21;454(7207):947-8
- <sup>5</sup> Saely, C.H., Geiger, K. ja Drexel, H. (2010): Brown versus white adipose tissue: a mini-review. *Gerontology.* 2012;58(1):15-23
- <sup>6</sup> Siiteri, P.K. (1987): Adipose tissue as a source of hormones. *Am J Clin Nutr* 45:277–282
- <sup>7</sup> Kershaw, E.E. ja Flier, J.S. (2004): Adipose tissue as an endocrine organ, *J Clin Endocrinol Metab* 89: 2548–2556
- <sup>8</sup> Nedergaard, J., Bengtsson, T., Cannon, B. (2011): Three years with human brown adipose tissue *Ann. N.Y. Acad. Sci.* ISSN 0077-8923
- <sup>9</sup> Dulloo A.G., Semec, S. (2000): Uncoupling proteins: Do they have a role in body weight regulation? *News Physiol Sci.* 2000 Dec; 15:313-318
- <sup>10</sup> Sampey, B.P., Vanhoose, A.M., Winfield, H.M., Freemerman, A.J., Muehlbauer, M.J., Fueger, P.T., Newgard, C.B ja Makowski, L. (2011): Cafeteria Diet Is a Robust Model of Human Metabolic Syndrome With Liver and Adipose Inflammation: Comparison to High-Fat Diet. *Obesity* (Silver Spring) 2011 Jun; 19(6):1009-17
- <sup>11</sup> Robinson, E. ja Hudson, A. (1998): Adrenoceptor pharmacology. ([http://www.tocris.com/pdfs/pdf\\_downloads/adrenoceptor\\_pharmacology\\_review.pdf](http://www.tocris.com/pdfs/pdf_downloads/adrenoceptor_pharmacology_review.pdf)) viitattu 23.5.2013
- <sup>12</sup> Bücheler, M.M, Hadamek, K. ja Hein, L. (2002): Two alpha(2)-adrenergic receptor subtypes alpha(2A) and Alpha(2C), inhibit transmitter release in the brain of gene-targeted mice. *Neuroscience* 2002;109(4):819-26
- <sup>13</sup> Lähdesmäki, J., Sallinen, J., MacDonald, E., Koblinka, B.K., Fagerholm, V. ja Scheinin, M. (2002): Behavioral and neurochemical characterization of alpha(2A)-adrenergic receptor knock-out mice. *Neuroscience* 2002;113(2):289-99
- <sup>14</sup> Sallinen, J., Haapalinna, A., Viitamaa, T., Koblika, B.K. ja Scheinin, M. (1998): Adrenergic alpha2C-receptors modulate the acoustic startle reflex, prepulse inhibition, and aggression in mice. *J Neurosci.* 1998 Apr 15;18(8):3035-42

- 
- <sup>15</sup> Rosengren, A.H., Jokubka, R., Tojjar, D., Granhall, C., Hansson, O., Li, D.Q., Nagaraj, V., Reinbothe, T.M., Tuncel, J., Eliasson, L., Groop, L., Rorsman, P., Salehi, A., Lyssenko, V., Luthman, H. ja Renström, E. (2009): Overexpression of alpha2A-adrenergic receptors contributes to type 2 diabetes. *Science* 2009; 327: 217–220.
- <sup>16</sup> Gnaiger, E. (2010): The Oxygraph for high resolution respirometry (version 8). *Mitochondrial Physiology Network* 06.01: 1-18
- <sup>17</sup> Cannon, B. ja Nedergaard, J. (2008): Studies of thermogenesis and mitochondrial function in adipose tissues. *Methods Mol Biol.* 2008;456:109-21
- <sup>18</sup> Gnaiger, E. (2008): Polarographic oxygen sensors, the oxygraph and high-resolution respirometry to assess mitochondrial function. *Drug-Induced Mitochondrial Dysfunction*; Dykens, J. ja Will Y. (2008) julkaissut John Wiley & Sons, Inc. Sivut 327-352